

UNIVERSITE DE GENEVE
Département de biochimie médicale
Laboratoire d'investigations cliniques

FACULTE DE MEDECINE
Professeur Pierre FAVARGER
Professeur Michel VALLOTTON

MISE AU POINT ET APPLICATIONS D'UNE MICROMETHODE POUR LE DOSAGE DE LA RENINE ET DE SON SUBSTRAT CHEZ LE RAT

THESE

présentée à la Faculté de médecine de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de docteur en biologie médicale

par

Djamchid Fereydoun BANICHAHI

de

Genève

Thèse No 14

GENEVE
Editions Médecine et Hygiène
1976

UNIVERSITE DE GENEVE
Département de biochimie médicale
Laboratoire d'investigations cliniques

FACULTE DE MEDECINE
Professeur Pierre FAVARGER
Professeur Michel VALLOTTON

MISE AU POINT ET APPLICATIONS D'UNE MICROMETHODE POUR LE DOSAGE DE LA RENINE ET DE SON SUBSTRAT CHEZ LE RAT

THESE

présentée à la Faculté de médecine de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de docteur en biologie médicale

par

Djamchid Fereydoun BANICHAHI

de

Genève

Thèse No 14

GENEVE
Editions Médecine et Hygiène
1976

La Faculté de médecine, sur le préavis du professeur Michel Vallotton, autorise l'impression de la présente thèse, sans prétendre par là émettre d'opinion sur les propositions qui y sont énoncées.

Genève, le 24 novembre 1976

Le doyen :
Marcel Jenny

Thèse No 14



Ce travail a été réalisé dans le Laboratoire de physiopathologie clinique, du Département de médecine de la Faculté de médecine de l'Université de Genève, professeur A. Muller. Il a été subventionné par le Fonds national suisse pour la recherche scientifique (No 3.7930.72).

Nous rendons hommage à feu le professeur Robert Veyrat, qui a assumé la direction de cette thèse jusqu'à son décès. Son jugement rigoureux et ses conseils, nous ont été très précieux.

Notre sincère reconnaissance va aussi au professeur M.B. Vallotton, qui a bien voulu prendre sous sa direction la suite de ce travail. Nous le remercions de sa constante disponibilité, des encouragements et des idées qu'il nous a prodigué durant la réalisation de cette étude.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

PLAN

1. INTRODUCTION

- 1.1. LE SYSTEME RENINE-ANGIOTENSINE
 - 1.1.1. La rénine
 - 1.1.2. Le substrat
 - 1.1.3. L'angiotensine I et II
- 1.2. LA REACTION ENZYMATIQUE
RENINE-SUBSTRAT
 - 1.2.1. Facteurs influençant la réaction
 - 1.2.2. Méthodes de dosage de la rénine
 - 1.2.2.1. Le dosage biologique
 - 1.2.2.2. Le dosage radioimmunologique
- 1.3. MODIFICATIONS DANS LA SYNTHÈSE
ET LA SÉCRETION DE RENINE
- 1.4. BUTS DE CETTE ÉTUDE

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

- 2.1. DÉTERMINATION DES CONDITIONS
D'INCUBATION DE LA RENINE AVEC
SON SUBSTRAT
 - 2.1.1. Préparation de la rénine rénale
 - 2.1.2. Préparation du substrat de rat
 - 2.1.3. Détermination de l'effet du pH
 - 2.1.4. Détermination de l'effet de la température

- 2.1.5. Détermination de l'effet de la concentration en rénine
- 2.1.6. Détermination de l'effet du temps d'incubation
- 2.1.7. Dosage de l'activité de la rénine plasmatique
- 2.1.8. Dosage biologique de l'angiotensine I
- 2.1.9. Dosage radioimmunologique de l'angiotensine I
- 2.1.10. Corrélation entre dosage biologique et radioimmunoessai
- 2.1.11. Récupération de l'angiotensine I

- 2.2. APPLICATION DE LA METHODE A L'ETUDE DE LA RENINE CHEZ DES RATS SURRENALECTOMISES
 - 2.2.1. Préparation des deux groupes de rats
 - 2.2.2. Dosage du contenu du rein en rénine
 - 2.2.3. Acidification de l'homogénat de rein
 - 2.2.4. Fixation pour la microscopie électronique

3. RESULTATS

- 3.1. DETERMINATION DES CONDITIONS D'INCUBATION
 - 3.1.1. Effet du pH
 - 3.1.2. Effet de la température
 - 3.1.1. Effet de la concentration en rénine
 - 3.1.4. Effet du temps d'incubation
 - 3.1.5. Corrélation entre dosage biologique et radioimmunoessai
 - 3.1.6. Récupération de l'angiotensine I
 - 3.1.7. Valeurs de l'activité de la rénine et du substrat plasmatiques chez le rat

- 3.2. RATS SURRENALECTOMISES
 - 3.2.1. Activité de la rénine plasmatique (ARP)
 - 3.2.2. Substrat de la rénine plasmatique (SRP)
 - 3.2.3. Contenu du rein en rénine (RR)
 - 3.2.4. Morphologie de l'appareil juxtaglomérulaire

4. DISCUSSION

- 4.1. LA METHODE
- 4.2. APPLICATION A L'ETUDE DE RATS
SURRENALECTOMISES

CONCLUSION GENERALE

BIBLIOGRAPHIE

1. INTRODUCTION

1.1. LE SYSTEME RENINE-ANGIOTENSINE

1.1.1. LA RENINE

La rénine (33,38 – 50,66), enzyme protéolytique d'un poids moléculaire d'environ 40'000, est synthétisée dans les cellules de l'appareil juxtaglomérulaire et sécrétée ensuite dans la circulation veineuse. Son activité s'exerce dans le plasma sanguin, où elle scinde un substrat protéique (52) synthétisé par le foie.

La rénine de rat peut être préparée à partir de reins de rats prélevés et conservés à -20°C . En général, on extrait la rénine en broyant le tissu rénal en présence d'une solution de NaCl 0,9 % et en congelant et dégelant l'homogénat à plusieurs reprises. Ces opérations permettent d'extraire l'enzyme des cellules de l'appareil juxtaglomérulaire. On peut estimer l'activité de l'enzyme ainsi préparé en le faisant réagir sur du plasma de rat comme source de substrat, ou sur du substrat de rat lyophilisé. La combinaison pepsine-trypsine attaque la rénine, ainsi que les alcalis forts, et les températures élevées la détruisent.

1.1.2. LE SUBSTRAT

La rénine qui est une endopeptidase, agit sur une α_2 -globuline d'un poids moléculaire d'environ 60'000 synthétisée par le foie : l'angiotensinogène (26,52). Tout comme celle de la rénine, la structure de l'angiotensinogène varie d'une espèce à l'autre. La séquence complète des acides aminés

n'en est pas connue. En revanche Skeggs et ses collaborateurs (52) ont déterminé la séquence des 14 acides aminés de l'extrémité N-terminale (fig.1). La concentration du substrat est assez constante dans les conditions normales (24,26-28), mais elle varie dans les cas suivants : augmentée chez les anéphriques, dans le cas d'hypertension maligne (47), durant la grossesse (56) ou en cours d'un traitement par les oestrogènes, elle est en revanche diminuée chez les rats surrénalectomisés.

La rénine attaque ce substrat entre les deux leucines en position 10 et 11 et scinde ainsi un décapeptide présentant peu d'activité biologique, l'angiotensine I.

1.1.3. L'ANGIOTENSINE I ET II

L'angiotensine I générée par la rénine est à son tour attaquée dans la circulation, en particulier dans les poumons, par un enzyme appelé "enzyme de conversion", qui transforme l'angiotensine I en angiotensine II en détachant le dipeptide his⁹ - leu¹⁰ (fig.1).

On connaît maintenant la structure de l'angiotensine I et II depuis une vingtaine d'année (41) et l'on peut en effectuer la synthèse in vitro (46). La séquence des acides aminés en est la même pour toutes les espèces animales étudiées, à l'exception de l'acide aminé en position 5, qui est une isoleucine chez l'homme et une valine chez le chien et le porc, par exemple.

L'angiotensine II est l'hormone active. Cet octapeptide possède le plus grand pouvoir de vasoconstriction (46).

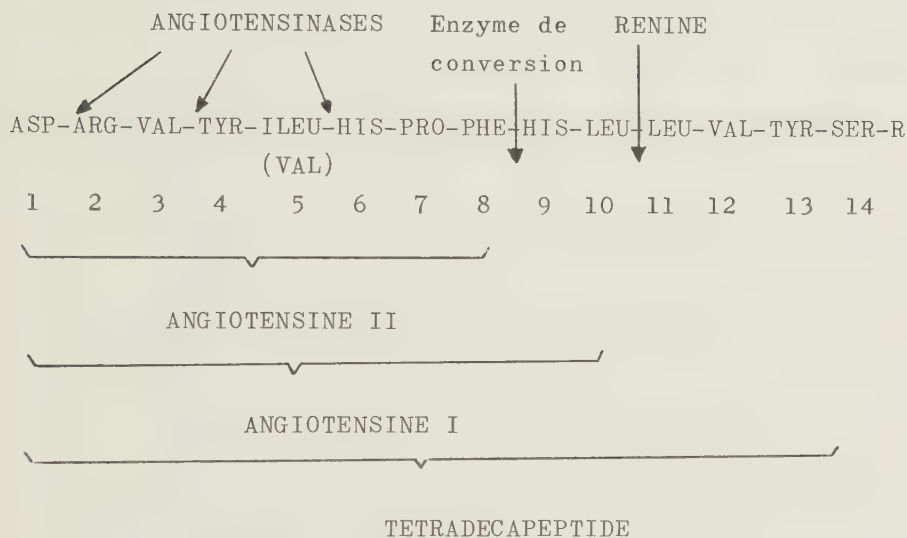


FIGURE 1 : Structures de l'angiotensine I, II et du tétradecapeptide N-terminal de l'angiotensinogène, avec les sites d'action des divers enzymes protéolytiques. R = α_2 -globuline

De plus, il stimule la sécrétion d'aldostérone (21). Il agit aussi sur le système nerveux sympathique, en facilitant la transmission de l'influx nerveux et en libérant des catécholamines de la médulla surrénalienne (35,40).

L'action biologique de l'angiotensine I est beaucoup plus faible que celle de l'angiotensine II (46). Par exemple, elle ne représente que le 1/5 de celle de l'angiotensine II pour ce qui est de l'effet presseur.

1.2. LA REACTION ENZYMATIQUE RENINE SUBSTRAT

1.2.1. FACTEURS INFLUENCANT LA REACTION

A l'instar de toutes les réactions enzymatiques, la réaction entre la rénine et l'angiotensinogène dépend de plusieurs facteurs importants.

Effet du pH : la réaction enzymatique présente une activité maximale pour un pH optimum, qui peut varier selon les espèces : 5,5 pour l'homme (19), 6,5 pour le rat et le lapin (1). Un pH fortement acide ou alcalin dénature la structure de l'enzyme ainsi que celle du substrat, et, de ce fait, la réaction devient nulle.

Effet de la température : la température agit sur la réaction enzymatique elle augmente la vitesse jusqu'à une température optimum. Au-dessus de cette température l'activité enzymatique ralentit pour devenir nulle à des températures élevées qui détruisent l'enzyme. Conservé à des températures très basses (-20°C ou moins), l'enzyme peut garder toutes ses propriétés cinétiques durant plusieurs années.

Effet de la concentration de rénine : Lorsque certaines conditions sont remplies (cinétique d'ordre zéro), la génération d'angiotensine I ne dépend que de la quantité de rénine présente dans le milieu d'incubation et la relation est linéaire. Lorsque l'on ajoute un excès de rénine, tout le substrat est épuisé, ce qui permet de mesurer sa concentration.

Effet de la concentration de substrat : En présence d'un excès de substrat, l'enzyme est saturé et la génération d'angiotensine I ne dépend que de la concentration de rénine. En revanche, si l'on abaisse la concentration en substrat, ce dernier devient un facteur limitant et influe sur la vitesse de la réaction enzymatique.

Effet du temps d'incubation : Si l'on choisit une quantité de substrat telle que sa concentration soit toujours en excès par rapport à celle de la rénine au cours du temps, il existe une relation linéaire entre la formation d'angiotensine et le temps d'incubation.

Effet des inhibiteurs : Il existe dans le plasma des phospholipides (2), des prostaglandines (30), qui peuvent freiner la réaction de la rénine. De plus, des angiotensinases peuvent dégrader l'angiotensine I générée. Le Na_2EDTA protège bien l'angiotensine I de l'activité de ces endopeptidases.

1.2.2. METHODES DE DOSAGE DE LA RENINE

Deux méthodes permettent de déterminer la quantité d'angiotensine I produite au cours de la réaction entre la rénine et son substrat : le dosage biologique et le dosage radioimmunologique.

1.2.2.1. LE DOSAGE BIOLOGIQUE

Le dosage biologique consiste à mesurer l'effet pressif de l'angiotensine sur le rat et, par comparaison avec un étalon, de déterminer la concentration d'angiotensine contenue dans l'échantillon(6). Cette méthode mise au point pour la première fois par Boucher en 1964 et coll (6), s'effectue en deux étapes : il y a d'abord la préparation et la vérification du dispositif, entre autre de la symétrie de réponse lors de l'introduction d'une solution standard d'angiotensine II dans chacune des veines jugulaires; puis vient le dosage proprement dit de l'angiotensine I, que le rat transforme immédiatement en angiotensine II, et dont on mesure l'effet pressif. Cette méthode est suffisamment sensible pour détecter des quantités de l'ordre de quelques nanogrammes par millilitre.

1.2.2.2. LE DOSAGE RADIOIMMUNOLOGIQUE

Pour utiliser la méthode radioimmunologique, il faut avoir un anticorps ou une protéine qui lie spécifiquement la substance à doser, et un traceur analogue radioactif de cette même substance. La méthode se base sur la réaction d'équilibre entre un antigène et son anticorps et sur le principe de la dilution isotopique. A l'équilibre, pour une quantité fixe d'anticorps, le nombre de complexes antigène - anticorps formés ne dépendra que de la concentration d'antigène présent. Si l'on introduit un antigène analogue radioactif, en quantité très faible, ses fractions libre et liée à l'anticorps seront proportionnelles à celles de l'antigène non marqué comme le prédit la loi de la dilution isotopique.

1.3.

MODIFICATIONS DANS LA SYNTHÈSE ET LA SÉCRÉTION DE RÉNINE

Il est généralement admis que la rénine est principalement synthétisée dans l'appareil juxtaglomérulaire du cortex rénal (8,10,36,49,58,59). La rénine y est stockée sous forme de granules contenus dans les cellules épithélioïdes. Le nombre et la taille de ces granules varient en général parallèlement à l'activité de la rénine plasmatique ou au contenu du rein en rénine (12,28,59). Cependant, on a aussi observé, dans certaines situations, une discordance entre le contenu en granules, la rénine rénale et la rénine plasmatique. Ainsi, après une surrénalectomie, l'activité plasmatique de la rénine est très élevée, alors que le contenu du rein en rénine demeure normal ou même bas, et que les cellules épithélioïdes ont perdu leurs granulations (3,17,42,51,60). En même temps, on note dans ces dernières cellules une intense activité de synthèse protéique. Les granules, par conséquent, ne doivent représenter qu'une forme de stockage de l'hormone et non une étape indispensable dans sa sécrétion.

Par ailleurs, on avait remarqué depuis plusieurs années déjà que la rénine peut exister sous diverses formes (22,26,41). Skeggs et coll (55) ont montré l'existence de deux formes de rénine chez le porc : l'acidification permettait de convertir la rénine I en rénine II. Par la suite, des résultats similaires démontrant l'existence d'une rénine acidifiable ont été obtenus dans d'autres espèces : chez l'homme, dans le rein (13), le liquide amniotique (13,34,37) et le plasma, (13,57) chez le porc (7) et le lapin (31). Cette "big renin" pourrait représenter la forme de stockage de

l'hormone à l'intérieur des granules, soit comme prohormone, soit comme complexe de l'enzyme avec une protéine inhibitrice (7).

Le mode de sécrétion de la rénine demeure cependant mal connu et il nous a paru intéressant d'appliquer la méthode de dosage de la rénine mise au point, à l'étude des modifications qui surviennent lorsque, après une stimulation maximale de la synthèse par la surrénalectomie, l'on bloque brusquement la sécrétion de rénine par un traitement substitutif avec de la désoxycorticostérone (DOCA) et du sel. L'hormone néo-synthétisée devrait, dans ce cas, s'accumuler dans des granules sous sa forme de stockage.

BUTS DE CETTE ETUDE

Nous nous sommes fixé un double but au cours des travaux que nous présentons, ci-après. D'abord nous avons déterminé les conditions qui permettent le dosage de l'activité de la rénine chez les petits animaux, aussi bien dans le plasma que dans des homogénats de tissus, à partir des petites quantités et des faibles volumes que l'on peut obtenir chez ces animaux.

Ce premier but une fois atteint, nous avons ensuite essayé, à l'aide de la méthode ainsi élaborée, de mieux comprendre les mécanismes qui président au stockage et à la sécrétion de la rénine chez le rat.

On retrouve dans chacun des chapitres de l'exposé qui va suivre : méthodes, résultats et discussion, la séparation en deux parties correspondant aux deux orientations que nous avons données à ce travail.

2. MATERIEL ET METHODES

2.1. DETERMINATION DES CONDITIONS D'INCUBATION DE LA RENINE ET DE SON SUBSTRAT

2.1.1. PREPARATION DE LA RENINE RENALE

L'extrait de rénine de rat a été obtenu à partir de reins de rats soumis à un régime normalement salé et ne subissant aucun traitement. On conserve les reins prélevés à -20°C , jusqu'à l'obtention d'une quantité suffisante de matériel.

Environ 50 de ces reins sont broyés en présence de sable fin lavé, congelé et dégelés à plusieurs reprises, selon la méthode décrite par Boucher et coll (6). Le volume de l'homogénat est porté à 150 ml avec du NaCl 0,9 % à 4°C . Après centrifugation, le surnageant est conservé à -20°C en aliquots de quelques millilitres. Lors de son utilisation, cet extrait de rein de rat est dilué 25 fois avec du NaCl 0,9 % à 4°C .

2.1.2. PREPARATION DU SUBSTRAT DE RAT

Le plasma de rats binéphrectomisés depuis 15 à 20 heures sert de source riche en substrat (36). Des rats mâles Wistar, pesant entre 450 et 500 gr, soumis à un régime librement salé, sont binéphrectomisés par une double incision latérale. On leur donne de l'eau ad libitum durant 15 à 20 heures. Après les avoir anesthésiés au Nembutal (50mg/kg de poids corporel). On les saigne par une section de l'artère carotidienne. Le sang, recueilli dans des tubes en polyéthylène contenant 0,5 ml d'EDTA à 38g/l dans l'eau (solution

amenée à pH 6,5 par NH_4OH concentré) est immédiatement refroidi à 4°C et centrifugé à 3'000 t/min durant 10 minutes, à la même température.

A 500ml de plasma, obtenu à partir de 100 rats, on ajoute du Na_2EDTA à une concentration finale de 0,06 M. Le pH est ajusté à 8,0 avec du NaOH 5N. Après une heure à température ambiante, la solution est refroidie à 4°C et le pH ajusté à 5,3 avec H_2SO_4 2,5 N. A ce mélange on ajoute du $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, à une concentration finale de 2,3 M, et on agite le tout énergiquement durant 10 minutes dans une ampoule à extraction.

On centrifuge à 3'000 t/min durant 40 minutes, et on sépare le précipité et le surnageant. Dans ce dernier, la concentration en protéines ne doit pas dépasser 10mg/ml. Le cas échéant, on précipite à nouveau les protéines avec du $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ à une concentration finale de 3 M. Les précipités sont repris avec 60 ml d'eau distillée et on centrifuge une nouvelle fois. On dialyse le surnageant pendant 24 heures contre de l'eau distillée à 4°C . Le dialysat est filtré et lyophilisé. On conserve le substrat semi-purifié ainsi obtenu dans un dessiccateur à -20°C .

Afin de s'assurer que la préparation ne contient ni rénine, ni endopeptidases, on incube une solution de substrat (19mg/ml H_2O) seule, sans adjonction de rénine, durant 12 heures à 37°C . Aucune libération d'angiotensine ne doit être observé.

En séparant les fractions libre ($F = \text{free}$) et liée ($B = \text{bound}$) du traceur, on peut en mesurer la radioactivité et établir le rapport $B/B+F$, égal à celui des fractions correspondantes de l'antigène non marqué. Une courbe standard établie avec des quantités connues d'antigène froid, permet de déterminer la quantité d'antigène dans l'échantillon à doser.

Cette méthode permet la mesure de substances dont les concentrations sont voisines de la picomole (10^{-12} mole). Elle a été appliquée à un grand nombre d'hormones, et en particulier à l'angiotensine I et II (61-65).

2.1.3. DETERMINATION DE L'EFFET DU pH

Pour étudier l'effet du pH, nous avons incubé 2ml d'une solution aqueuse de substrat à 28,5mg/ml, en présence de 1,5ml de DOWEX 50W-X2 (NH_4^+) et de 0,1ml d'extrait de rein dilué 50 et 500 fois, pour des périodes de 3 heures, respectivement 12 heures, à 37° C. Ces deux durées d'incubation ont été choisies, car ce sont celles que nous avons utilisées pour doser les extraits de reins (3 heures) et l'activité plasmatique (12 heures). Nous avons fait varier le pH de 4,0 à 8,0, avec du Na OH 0,1N. On interrompt la réaction en plaçant les tubes dans la glace à 4° C. L'angiotensine I générée a été dosée par la méthode biologique.

2.1.4. DETERMINATION DE L'EFFET DE LA TEMPERATURE

2ml d'une solution aqueuse de substrat (28,5mg/ml) sont incubés durant 30 minutes, à pH 6,5, en présence de 1,5ml de DOWEX 50W-X2 (NH_4^+) et de 0,1ml d'extrait de rein dilué 50 fois, à 27°, 32°, 37° ou 42° C. L'angiotensine I ainsi générée est mesurée par dosage biologique.

2.1.5. DETERMINATION DE L'EFFET DE LA CONCENTRATION EN RENINE

Nous avons fait varier la quantité de rénine en incubant de 0,1 à 2,0ml d'extrait de rein dilué 50 fois, en présence de 1ml d'une solution aqueuse de substrat (38,5mg/ml), à pH 6,5 et de 1,5ml de DOWEX 50W-X2 (NH_4^+) durant 3 heures et à 37° C. Le dosage biologique a servi à doser l'angiotensine I générée.

2.1.6. DETERMINATION DE L'EFFET DU TEMPS D'INCUBATION

A 1ml d'une solution aqueuse de substrat (13mg/ml), on ajoute 0,1ml d'extrait de rein dilué 50 fois et 1,5ml de DOWEX 50W-X2 (NH_4)⁺. Ce mélange incubé à pH 6,5 et à 37° C, durant des périodes de 15, 30, 45 ou 90 minutes. L'angiotensine I générée est dosée par la méthode biologique.

2.1.7. DOSAGE DE L'ACTIVITE DE LA RENINE PLASMATIQUE

Ce dosage nécessite au préalable une bonne mise en solution du substrat lyophilisé. A cet effet, 1,5g de substrat sont dissous dans 29ml H_2O distillée, auxquels on ajoute 0,4ml d'EDTA à 15 % et 0,4ml de Na_3Na à 1 %. On ajuste le pH à 6,5 et on conserve 12 à 24 heures à 4° C. On filtre enfin la solution et on réajuste le pH à 6,5.

Pour obtenir le plasma, on soigne les rats, anesthésiés au Nembutal, par l'artère carotidienne. Le sang est recueilli dans des tubes en polyéthylène contenant 0,5ml d'EDTA à 38g/l (solution aminée à pH 6,5 par NH_4OH concentré) et immédiatement refroidi à 4° C, puis centrifugé.

La réaction pour le dosage de la rénine plasmatique s'effectue en présence de 1,5ml de résine DOWEX 50W-X2 sous forme NH_4 ⁺ (suspension dans un tampon d'acétate d'ammonium 0,2 M à pH 6,0), de 3ml de substrat de rat mis en solution la veille et de 0,1ml du plasma à doser. Le mélange, porté au pH 6,5, est incubé 12 heures à 37° C,

dans des tubes de verre. On arrête la réaction, en plaçant les tubes sur de la glace. Le contenu de chaque tube est ensuite versé sur une colonne de verre (0,8x20cm) contenant 0,5ml de DOWEX 50W-X2. On lave la résine avec 10ml de tampon d'acétate d'ammonium 0,2_M pH 6,0, puis avec 20ml d'acide acétique à 10 % dans l'eau et enfin avec 30ml H₂O distillée.

L'angiotensine I est ensuite éluée du DOWEX avec 7ml de diéthylamine 0,1 N et 7ml de NH₄OH 0,2 N, que l'on recueille dans un ballon en verre pyrex. On sèche les éluats par évaporation sous vide et on conserve les ballons à - 20° C jusqu'au moment du dosage, qui peut se faire soit par la méthode biologique, soit par la méthode radioimmunologique.

2.1.8. DOSAGE BIOLOGIQUE DE L'ANGIOTENSINE I

La veille du dosage, on binéphrectomise des rats mâles Wister, pesant de 120 à 150 grammes, sous anesthésie à l'éther. Le lendemain, on anesthésie les rats en Nembutal (50mg/kg de poids corporel). La trachée est alors canulée et les jugulaires droite et gauche cathétérisées. On introduit ensuite une sonde dans l'une des carotides pour mesurer, au moyen d'un manomètre à mercure, la pression artérielle que l'on enregistre sur un kimographe.

Les cathéters une fois en place, ils sont raccordés à des microseringues contenant une solution alcoolique standard d'angiotensine II (Hypertensine, Ciba) contenant 1ug/ml d'éthanol à 20 %. Des volumes identiques de la solution d'angiotensine II sont injectés successivement dans chaque

jugulaire, et l'on enregistre à chaque fois l'augmentation de la pression artérielle sur le kimographe. Lorsque, pour un même volume introduit dans chaque jugulaire la réponse pressive obtenue est identique, on considère que la préparation est symétrique et prête au dosage des échantillons. Cette symétrie s'acquiert grâce à un jeu de réglage des cathéters.

On dissout l'angiotensine I évaporée à sec dans les ballons en pyrex avec une solution aqueuse d'éthanol à 20 % (1 à 10 ml, selon la quantité d'angiotensine I). On introduit cette solution dans une microsiringue, que l'on met à la place de l'une de celles qui ont servi à vérifier la symétrie de réponse de la préparation.

Sous l'action de l'enzyme de conversion, l'angiotensine I ainsi injectée se transforme sans délai en angiotensine II, qui exerce son effet pressif. En essayant d'encadrer la réponse pressive obtenue avec un volume fixé de la solution d'angiotensine I à doser, par des réponses identiques obtenues avec la solution standard d'angiotensine II, on peut estimer la concentration d'angiotensine I dans l'échantillon à doser. On exprime ainsi les résultats en nanogrammes d'angiotensine I par millilitre et par heure d'incubation. Cette méthode permet de détecter des concentrations d'angiotensine I de l'ordre de $\pm 6 \text{ ng/ml}$, avec une précision de 3 ng.

2.1.9. DOSAGE RADIOIMMUNOLOGIQUE DE L'ANGIOTENSINE I

Nous avons aussi dosé l'angiotensine I par la méthode radio-immunologique décrite par Valloton (65). L'angiotensine I

éaporée à sec dans les ballons en pyrex est aussi dissoute avec une solution aqueuse d'éthanol à 20 % (1 à 10ml, selon la quantité d'angiotensine I). A 0,05ml de cette solution on ajoute 0,95ml de tampon tris-acétate à pH 7,4, contenant 1g/l de lysozyme et 10ul de 125-I angiotensine I.

On incube ce mélange 16 à 18 heures à 4° C. Le lendemain, on sépare les fractions libre et liée du traceur par une précipitation avec 1ml d'une suspension de charbon actif à 1 % dans du tampon barbital à pH 7,4. On centrifuge 10 minutes à 3'000 t/min, on décante et on lave le culot avec 1ml de tampon barbital à pH 7,4. Après une nouvelle centrifugation, on ajoute le surnageant au premier et on compte la radioactivité contenue dans le charbon et dans les surnageants. En se reportant à une courbe standard établie avec des quantités connues d'angiotensine I, on peut déterminer la quantité d'hormone dans l'échantillon à doser.

2.1.10. CORRELATION ENTRE DOSAGE BIOLOGIQUE ET RADIOIMMUNOESSAI

Pour vérifier la validité des deux méthodes de dosage, nous avons effectué des mesures par les deux techniques sur des échantillons de plasma et d'extrait de rein contenant entre 62 et 2850 ng/ml d'angiotensine I. Nous avons ensuite établi une corrélation entre les valeurs obtenues par les deux méthodes.

2.1.11. RECUPERATION DE L'ANGIOTENSINE I

Afin de déterminer quelle proportion de l'angiotensine I, générée au cours de l'incubation rénine-substrat, est récupérée au terme des nombreuses étapes que constituent le

dosage, nous avons incubé un mélange de 3ml de solution de substrat (19mg/ml), 0,1ml de plasma de rat binéphrectomisé et 2 ml de DOWEX 50W-X2 (NH_4^+) avec des quantités de standards d'angiotensine I allant de 100 à 500 ng. L'incubation a duré 12 heures, à 37° C. A la fin de l'incubation, on a procédé aux étapes normales (élution sur colonne, évaporation à sec, dissolution) et dosé l'angiotensine I par la méthode biologique.

2.2. APPLICATION DE LA METHODE A L'ETUDE DE LA RENINE CHEZ DES RATS SURRENALECTOMISES

2.2.1. PREPARATION DES 2 GROUPES DE RATS

Deux groupes de rats mâles Wistar pesant environ 300 g, ont été préparés et soumis à trois expériences identiques (fig. 2).

Premier groupe : les rats, anesthésiés au Nembutal subissent une surrénalectomie bilatérale par approche dorso-latérale. On leur donne ensuite un régime libre durant 5 jours (Altromine standard 1'320 contenant 100 mEq/kg de sodium). On les soumet ensuite durant trois jours à un régime sans sel (Altromine C 1'036 contenant 20 mEq/kg de sodium). Le deuxième jour de ce régime sans sel, on leur administre un diurétique (2mg de Lasix, par injection sous cutanée). A la fin de ce traitement, les rats sont saignés et leurs reins sont prélevés et conservés à -20°C ou fixés pour l'étude histologique.

Second groupe : les rats subissent d'abord le même traitement que ceux du premier groupe. Après le régime sans sel on les soumet à un apport abrupt de sodium (régime libre accompagné de Na CL 0,9 % comme seule boisson) et à un traitement substitutif avec de la désoxycorticostérone (3x2mg de Percorten R sous-cutané par jour), durant 48 heures. Puis on sacrifie les rats comme dans le premier groupe.

Sur chaque rat, dans les deux groupes, les trois paramètres suivants ont été mesurés : activité de la rénine (ARP),

Rats mâles Wistar : 300 g

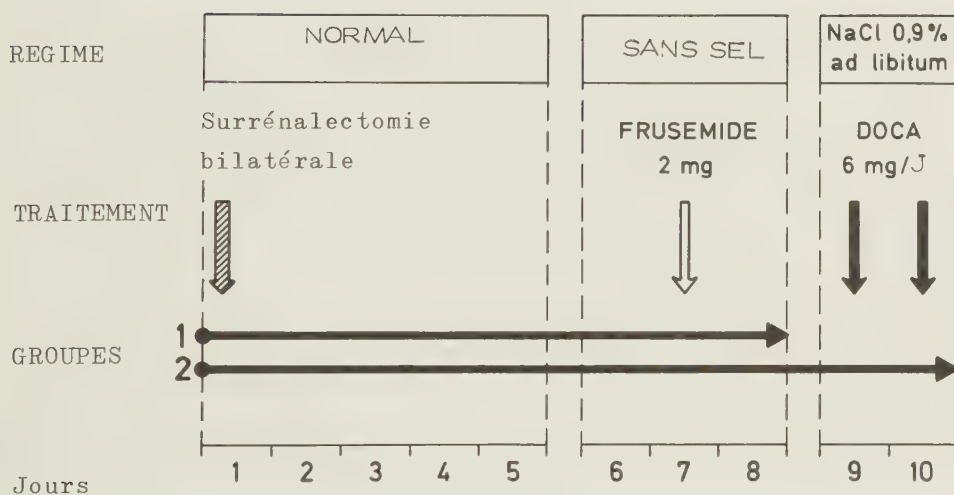


FIGURE 2 : Protocole de l'étude sur des rats surrenalectomisés

substrat de la rénine plasmatique (SRP) et rénine rénale (RR). Parallèlement, nous avons étudié, sur d'autres rats traités identiquement, l'aspect histologique ultrastructurel de l'appareil juxtaglomérulaire en microscopie électronique.

2.2.2. DOSAGE DU CONTENU DU REIN EN RÉNINE

Aussitôt après le prélèvement du dang pour le dosage de la rénine et du substrat plasmatiques, les deux reins des rats sont enlevés et conservés à -20°C . L'un des deux est ensuite homogénéisé dans un potter de 50ml avec 20ml de Na CL 0,9 % à 4°C . L'homogénat est regelé à -20°C à 5 reprises. On porte le volume de l'homogénat à 100ml avec du Na CL 0,9 % à 4°C , puis on centrifuge 10 minutes à 3'000 t/min et on conserve le surnageant à -20°C . Des aliquots de 0,05ml de cet homogénat, dilué 5 fois avec Na CL 0,9 % sont ensuite incubés durant 3 heures à 37°C et pH 6,5, en présence de 1ml de solution de substrat (19 mg/ml) et de 1,5ml de DOWEX 50W-X2 (NH_4)⁺. L'angiotensine I générée est dosée par la méthode radioimmunologique.

2.2.3. ACIDIFICATION DE L'HOMOGENAT DE REIN

Pour mettre en évidence la présence d'une rénine acidifiable dans l'homogénat de rein, 10ml de ce dernier, dilué avec 40ml de Na CL 0,9 %, sont dialysés durant 24 heures à 4°C contre un tampon glycolle de Sörensen à pH 2,5 puis à nouveau 24 heures contre un tampon phosphate 1/15 M selon Sörensen à pH 6,5. Parallèlement, un échantillon semblable d'homogénat de rein est dialysé durant 48 heures contre un tampon phosphate 1/15 M à pH 6,5 et sert de

contrôle. On procède ensuite au dosage de la rénine comme indiqué ci-dessus.

2.2.4. FIXATION POUR LA MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

La partie morphologique de cette étude n'entrant pas dans le cadre de cette thèse, nous n'en décrivons pas les méthodes utilisées qui sont en outre présentées ailleurs en détail (53).

3. RESULTATS

3.1. DETERMINATION DES CONDITIONS D'INCUBATION

3.1.1. EFFET DU pH

Lorsque l'on fait varier le pH de 4,0 à 8,0 la réaction enzymatique entre la rénine de rat et son substrat homologue atteint une vitesse maximale à pH 6,5, que l'incubation dure 3 ou 12 heures (fig. 3 et 4). Si l'on fait varier le pH d'une unité autour de ce pH optimum, la vitesse de réaction baisse déjà de 50 %. Il faut noter que le même optimum de pH s'observe si l'on utilise du plasma, au lieu de l'extrait de rein, comme source de rénine.

3.1.2. EFFET DE LA TEMPERATURE

La génération d'angiotensine I augmente d'environ 5 fois, lorsque l'on augmente la température d'incubation de 27° à 32° C (fig. 5). Elle triple lorsque l'on passe de 37° à 42° C. En revanche, la vitesse de réaction ne semble pas augmenter entre 32 et 37° C (fig. 5).

3.1.3. EFFET DE LA CONCENTRATION EN RENINE

Lorsque l'on augmente la quantité de rénine dans le milieu d'incubation de 0,1 à 0,5ml d'extrait de rein, la quantité d'angiotensine I générée augmente linéairement (fig. 6). Au-dessus de 0,5ml d'extrait de rein, la génération d'angiotensine I atteint un plateau qui représente le maximum de la réaction pour les conditions choisies.

Angiotensine I

(ng/ml)

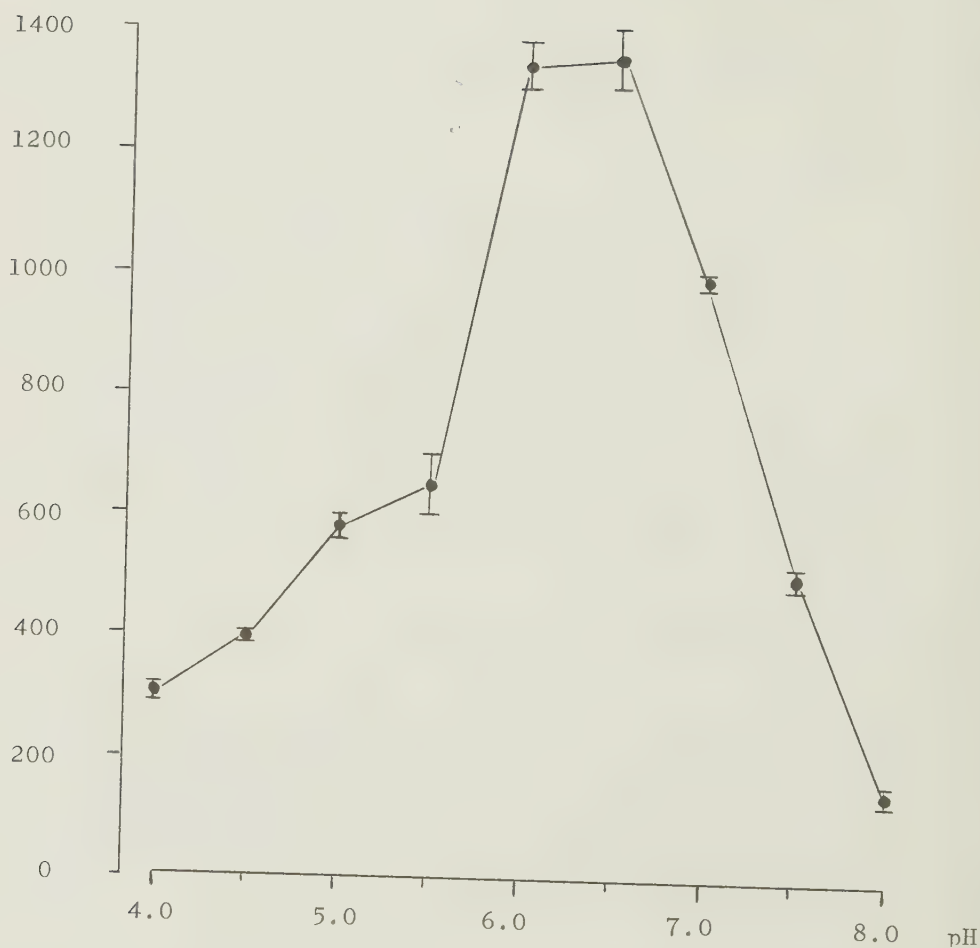


FIGURE 3 : Effet du pH sur la génération d'angiotensine I à partir de 0.1 ml d'extrait de reih dilué (1/50) et de 2 ml de substrat de rat (28.5 mg/ml), durant 3 heures. Chaque point représente la moyenne $\pm$ DS de deux déterminations effectuées en dupliqués.

Angiotensine I

(ng/ml)

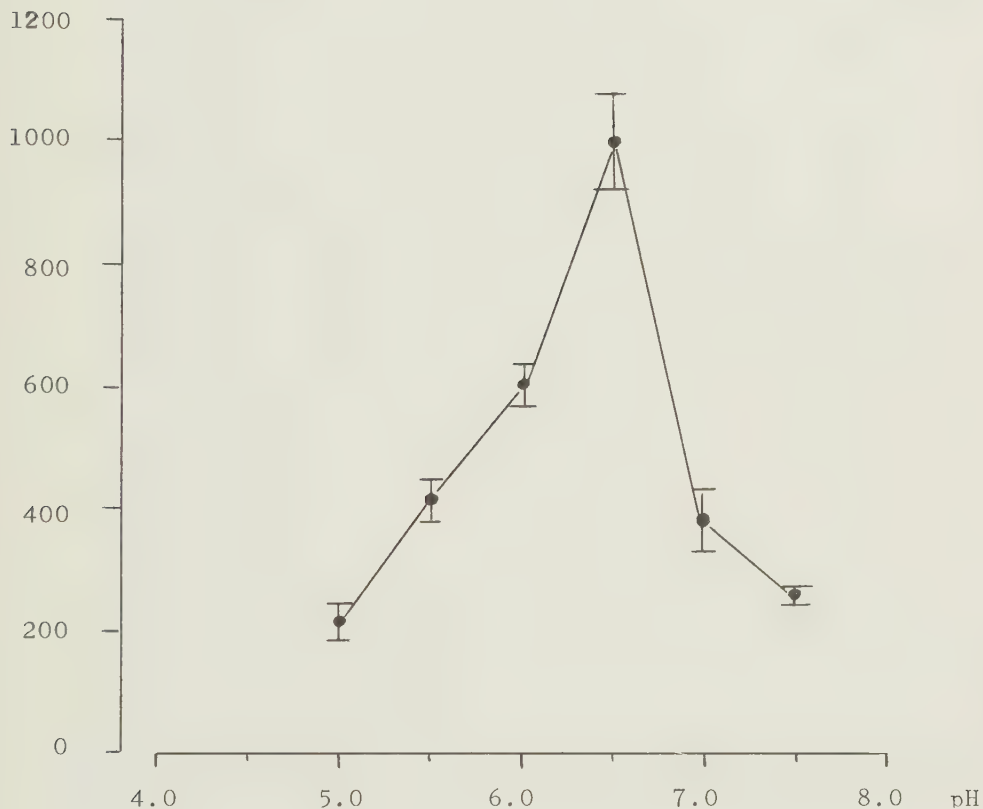


FIGURE 4 : Effet du pH sur la génération d'angiotensine I à partir de 0.1 ml d'extrait de rein dilué (1/500) et de 2 ml de substrat de rat (28.5 mg/ml), durant 12 heures. Chaque point représente la moyenne $\pm$ DS de deux déterminations effectuées en dupliqués.

Angiotensine I

(ng/ml)

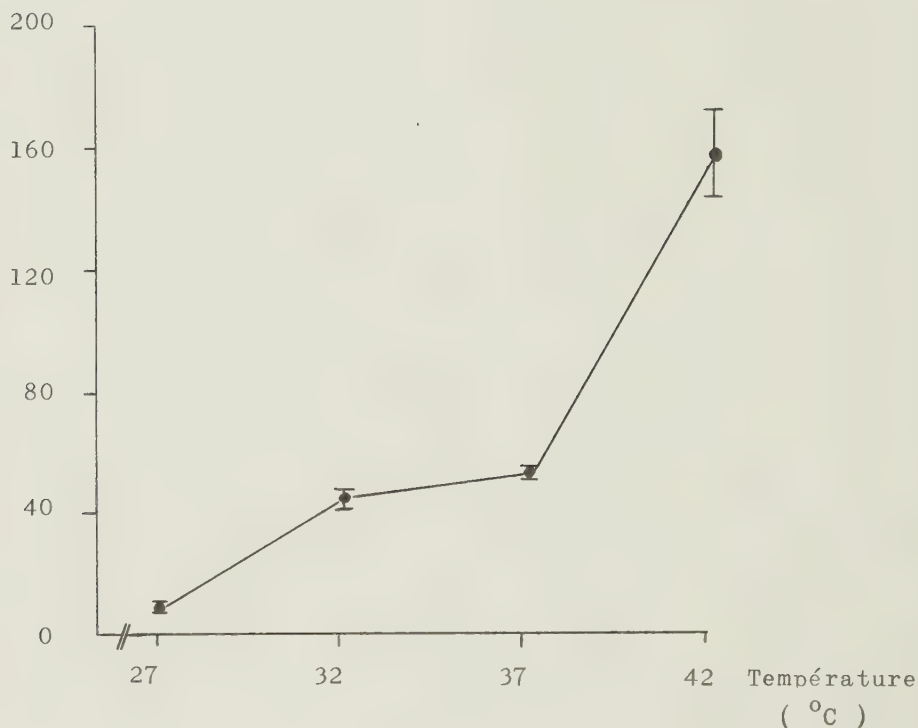


FIGURE 5 : Effet de la température sur la génération d'angiotensine I à partir de 0.1 ml d'extrait de rein dilué (1/50) et de 2 ml de substrat de rat (28.5 mg/ml), durant 30 minutes. Chaque point représente la moyenne $\pm$ DS de deux déterminations effectuées en dupliqués.

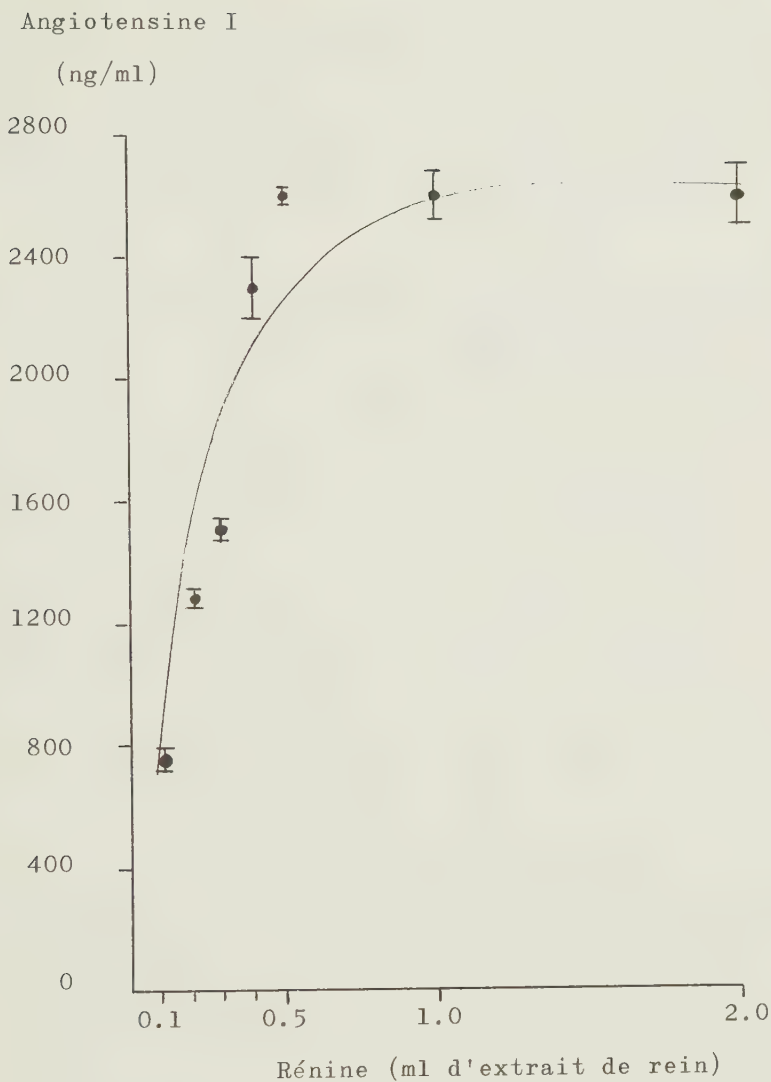


FIGURE 6 : Effet de la quantité de rénine sur la génération d'angiotensine I. 1 ml de substrat de rat est incubé en présence de quantités croissantes d'extrait de rein, durant 3 heures. Chaque point représente la moyenne $\pm$ DS de deux déterminations effectuées en dupliqués.

3.1.4. EFFET DU TEMPS D'INCUBATION

La quantité d'angiotensine I générée augmente linéairement, lorsque l'on prolonge le temps d'incubation de 15 à 90 minutes sans modifier les autres paramètres (fig. 7).

3.1.5. CORRELATION ENTRE DOSAGE BIOLOGIQUE ET RADIOIMMUNOESSAI

A partir de 12 déterminations effectuées à la fois par le dosage biologique et la technique radioimmunologique, nous avons pu établir une excellente corrélation entre les deux méthodes aussi bien pour des valeurs basses (10 – 15 ng/ml) que pour de fortes concentrations (2'800ng/ml) (fig. 8). Le coefficient de corrélation est de 0,9967 et l'équation de la droite de régression : $y = -0,02 + 1,01 \cdot x$.

3.1.6. RECUPERATION DE L'ANGIOTENSINE I

Le tableau I montre que, pour des quantités d'angiotensine I de 100 à 500ng, ajoutées à du plasma de rat binéphrectomisé avant l'incubation avec du substrat, on récupère en moyenne $87,5 \pm 7,9$ % (n=6) de l'angiotensine ajoutée, à la fin de toutes les opérations qui composent le dosage.

3.1.7. VALEURS DE L'ACTIVITE DE LA RENINE ET DU SUBSTRAT PLASMATIQUE CHEZ LE RAT

Les dosages de l'activité de la rénine plasmatique sur des rats anesthésiés au Nembutal selon la méthode décrite aux paragraphes 2.1.7. à 2.1.9, ont donné une valeur moyenne de $15,2 \pm 4,9$ ng/ml/h (n=19). Les valeurs individuelles

Angiotensine I
(ng/ml)

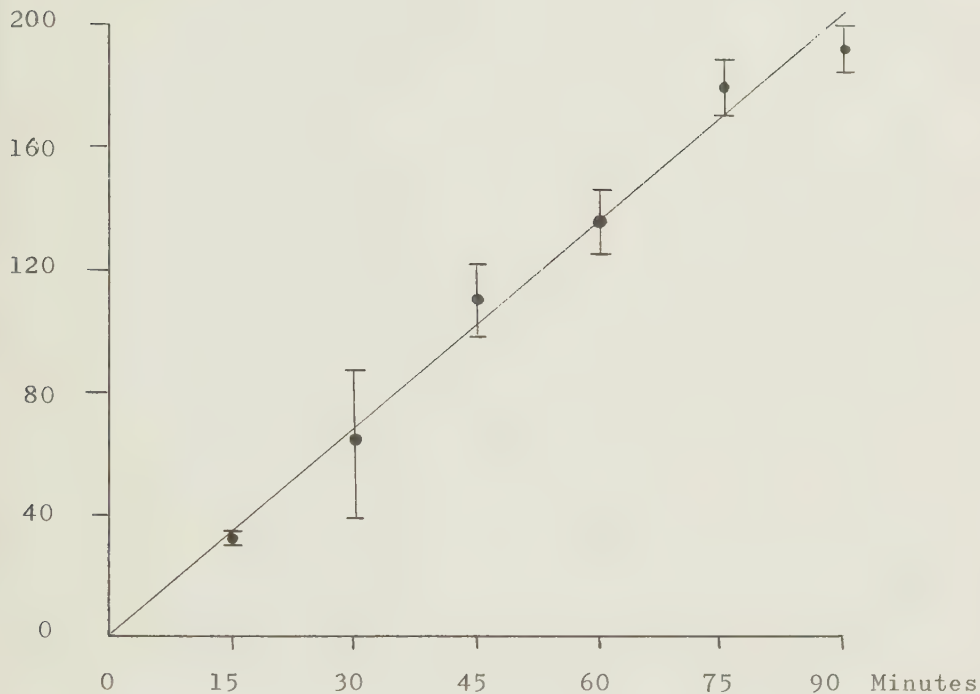
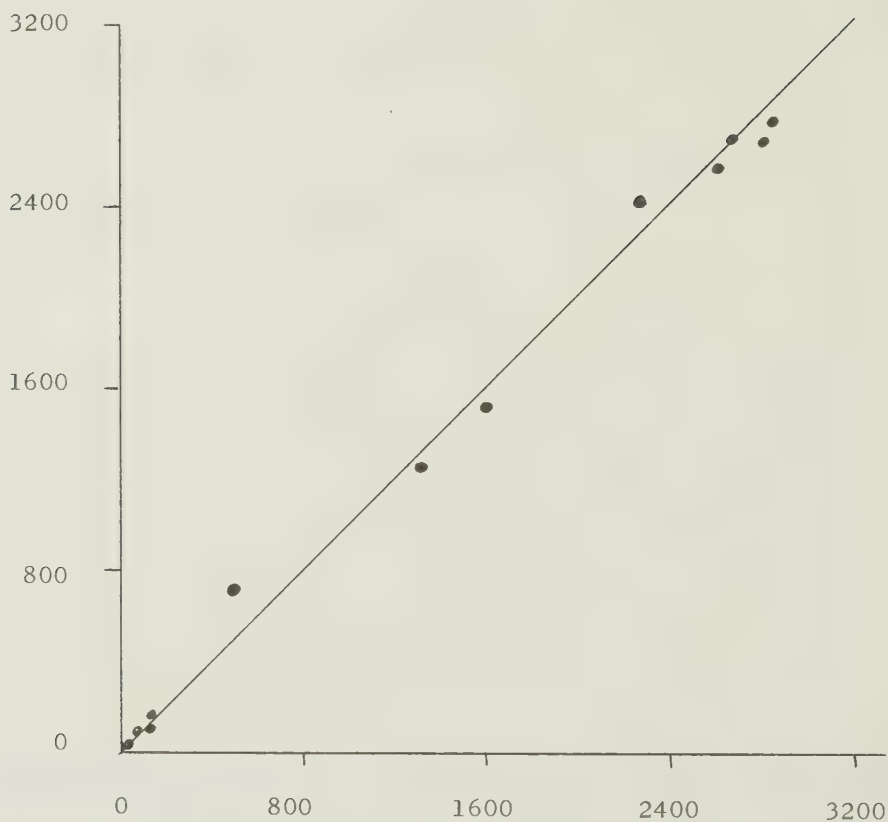


FIGURE 7 : Effet du temps d'incubation sur la génération d'angiotensine I à partir de 0.1 ml d'extrait de rein et de 1 ml de substrat de rat (19 mg/ml).

Chaque point représente la moyenne $\pm$ DS de deux déterminations effectuées en dupliqués.

DOSAGE BIOLOGIQUE

(ng angiotensine I/ml)



DOSAGE RADIOIMMUNOLOGIQUE (ng angiotensine I/ml)

FIGURE 8 : Corrélation entre dosage biologique et dosage radio-immunologique.

$$y = -0.02 + 1.01x$$

$$r = 0.9967$$

$$n = 12$$

$$P < 0.001$$

TABLEAU 1

Récupération de l'angiotensine I

Expérience	Angiotensine I ajoutée (ng)	Angiotensine I récupérée (ng)	Taux de récupération (%)
1	0	0	-
2	0	0	-
3	100	100	100
4	100	87.5	87.5
5	300	262.5	87.5
6	300	225	75
7	500	437.5	87.5
8	500	437.5	87.5

Récupération moyenne : $87.5 \pm 7.9 \%$

variaient de 7,8 à 26,1 ng/ml/h. Les mêmes dosages effectués chez des rats anesthésiés à l'éther ont donné une valeur moyenne significativement ($P < 0,001$) supérieure ($31,3 \pm 3,7$ ng/ml/h) ($n=5$), avec des variations allant de 26,0 à 36,5 ng/ml/h.

Le dosage du substrat de la rénine dans le plasma a donné des valeurs de $320 \pm 16,9$ ng d'angiotensine I/ml ($n=8$) pour des rats soumis à un régime libre, et de 275 ± 15 ng/ml ($n=4$) pour des rats soumis au régime sans sel.

3.2. RATS SURRENALECTOMISES

3.2.1. ACTIVITE DE LA RENINE PLASMATIQUE (ARP)

Huit jours après surrénalectomie bilatérale et sous déplétion sodique, les rats du premier groupe ont une ARP moyenne de $1142 \pm 345 \text{ ng/ml/h}$ ($n=12$), valeur significativement supérieure ($P < 0,001$) à celle que l'on obtient avec des rats normaux. Dans le second groupe l'ARP présente une valeur moyenne significativement inférieure ($P < 0,001$) à celle du premier groupe ($50,5 \pm 33,7 \text{ ng/ml/h}$) ($n=11$), qui reste cependant aussi significativement plus élevée ($P < 0,001$) que celle des rats normaux.

3.2.2. SUBSTRAT DE LA RENINE PLASMATIQUE (SRP)

Dans le premier groupe de rats, les valeurs de SRP sont très basses : $66,1 \pm 9,2 \text{ ng/ml}$ ($n=12$), alors que dans le second groupe elles s'élèvent à $205,2 \pm 169,5 \text{ ng/ml}$ ($n=11$) et se rapprochent des valeurs normales ($320 \pm 16,9 \text{ ng/ml}$) ($n=8$). La différence entre les deux groupes est significative ($P < 0,05$), mais seule la valeur de SRP du premier groupe est significativement plus basse ($P < 0,001$) que celle des contrôles.

3.2.3. CONTENU DU REIN EN RENINE (RR) (fig. 9)

La valeur de rénine rénale dans le premier groupe s'élève à $104,4 \pm 73,3 \text{ ng/mg}$ de tissu rénal ($n=12$), et à $134,5 \pm 47,1 \text{ ng/mg}$ ($n=11$) dans le second groupe. La différence entre les deux groupes n'est pas significative ($P > 0,05$). Elle le devient cependant après acidification à pH 2,5

$219,9 \pm 109,9$ ng/mg pour le premier groupe et $562 \pm 274,7$ ng/mg pour le second ($P < 0,001$). De plus, pour chaque groupe, l'augmentation de RR due à l'acidification est significative : le RR double dans le premier groupe ($P < 0,001$) et quadruple dans le second ($P < 0,01$). (Fig. 9)

3.2.4. MORPHOLOGIE DE L'APPAREIL JUXTAGLOMERULAIRE

Les résultats de cette partie de l'étude sont décrits en détail ailleurs (53). Nous ne citerons ici, à titre informatif, que les grandes lignes de ces résultats.

Huit jours après surrénalectomie et sous stimulation par une déplétion sodique (groupe 1); les cellules épithélioïdes de l'appareil juxtaglomérulaire présentent un fort développement du réticulum endoplasmique rugueux et de l'appareil de Golgi. Elles contiennent de nombreuses mitochondries. En revanche, on n'y trouve que peu de granules sécrétoires.

A l'opposé, si l'on bloque par la DOCA et un apport de sel la stimulation induite par la surrénalectomie et la déplétion sodique (groupe 2), les cellules épithélioïdes présentent un grand nombre de granules sécrétoires, alors que les autres organelles cytoplasmiques diminuent d'importance. Fait marquant, de nombreux granules présentent une certaine périodicité dans leur structure, dénotant la présence de corps cristallins, en particulier au voisinage de l'appareil de Golgi.

ANGIOTENSINE I

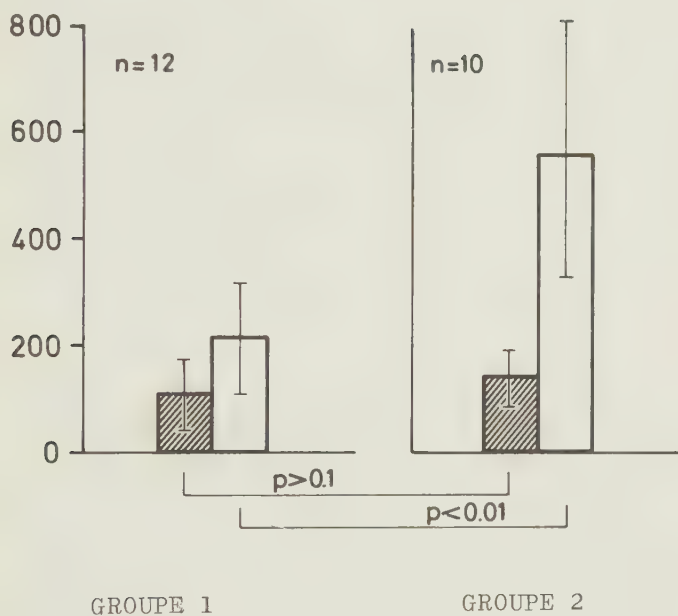
 $(\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu rénal)

FIGURE 9 : Contenu du rein en rénine chez des rats surrénalectomisés,

avant



et après



acidification.

4. DISCUSSION

4.1. LA METHODE

L'activité de la rénine plasmatique chez les petits animaux ne peut être déterminée par des techniques courantes, car le volume des prélèvements sanguins qu'elle exige réduit la volémie et augmente ainsi la sécrétion de rénine.

Nous avons donc tenté, dans la première partie de ce travail, d'établir les conditions qui permettent d'effectuer des dosages de rénine sur des volumes de plasma de quelques centaines de microlitres.

Nous nous sommes inspirés, dans cette recherche, des travaux déjà publiés par Boucher et coll (5), qui ont élaboré une méthode de dosage à partir de 0,1ml de plasma de rat, en présence de substrat homologue. Cette méthode nous paraît préférable à celle mise au point par Alexandre et coll (1), car cette dernière comporte une incubation avec du substrat hétérologue, ce qui, pour compenser la baisse de vélocité de la réaction, exige des quantités plus grandes de rénine et, par conséquent, de plasma.

Les études cinétiques que nous avons entreprises sur la réaction enzymatique entre la rénine de rat et son substrat semi-purifié ont montré l'importance de plusieurs facteurs physico-chimiques.

Dans notre système d'incubation le pH optimum est de 6,5, que l'incubation dure 3 heures pour un extrait de rein, ou 12 heures pour un échantillon de plasma. Cette valeur de

pH est semblable à celle qu'ont obtenue Ménard et Catt (36) pour le rat. La rénine de lapin semble présenter le même optimum (1), alors que pour l'homme, on obtient une valeur plus basse de 5,5 (6).

Nos résultats montrent aussi l'importance d'un bon ajustement du pH. Une variation d'une unité, en effet, suffit à diminuer l'activité de la rénine de moitié. Il est aussi intéressant de noter que, comme pour beaucoup d'autres enzymes, le pH optimum ne correspond pas au pH physiologique.

La température est aussi un facteur important qui affecte fortement la réaction enzymatique entre la rénine et son substrat. Nos résultats montrent que entre 27° et 32° C, la vitesse de réaction augmente de 5 fois, et de 3 fois entre 37° et 42° C, alors que entre 32° et 37° C, elle ne semble pas varier. Cette absence de linéarité dans la relation entre l'angiotensine générée et la température, ne permet pas de calculer un coefficient de température (Q_{10}) exact. On peut cependant estimer un coefficient moyen qui se rapproche de 6 pour l'intervalle de température entre 27° et 34°. Cette valeur, bien supérieure à la valeur que l'on mesure habituellement ($Q_{10}=2$), se rapproche de celles obtenues par Favre (18,19) avec de la rénine humaine et un substrat tétradécapeptide. Ici encore, des variations de températures vers des valeurs plus élevées que 37° C au cours d'un dosage peuvent sensiblement affecter les résultats.

L'études sur l'effet de la quantité de rénine permet de déterminer dans quelles circonstances l'on respecte les

critères d'une cinétique d'ordre zéro, condition indispensable pour que le dosage soit fidèle. Dans ce cas, en effet, la quantité de substrat se trouve en excès, et l'angiotensine générée ne dépend que de la rénine présente dans le milieu d'incubation.

Dans notre système, la génération d'angiotensine I est linéaire durant 90 minutes à 37° C. Favre (18) obtient une même relation avec du plasma humain, alors que de Senarclens (52) aboutit à un plateau après 45 minutes. Les conditions de la réaction (concentrations de substrat et de rénine) expliquent, dans ce dernier travail, l'obtention rapide de ce plateau.

Nous avons eu l'occasion, au cours de nos expériences, de passer de la méthode de dosage biologique à la technique radioimmunologique qui permet d'effectuer un plus grand nombre de dosages en un temps plus court. Il fallait au préalable s'assurer que les deux techniques mesuraient bien la même variable : l'angiotensine I. Aussi avons-nous établi une corrélation entre les résultats obtenus par les deux méthodes. La corrélation est excellente et la pente se rapproche de 1, bien que les valeurs obtenues par radio-immunoessai soient en moyenne légèrement supérieures à celles du dosage biologique. Cette identité dans les résultats produits par les deux méthodes a aussi été démontrée par Kotchen et al. (29) avec du plasma humain.

Les expériences de récupération démontrent d'une part que les angiotensinases et l'enzyme de conversion contenus dans le plasma ou les extraits de reins, sont efficacement inhibés par l'EDTA, et, d'autre part, que les pertes au

cours des diverses manipulations (élution, évaporation à sec, dissolution, pipetages) se limitent à un minimum.

Ces conditions une fois fixées, nous avons appliqué la méthode à l'étude de la rénine et du substrat plasmatique chez le rat. Nos dosages, outre une bonne reproductivité, montrent que le type d'anesthésie choisi peut faire varier considérablement l'activité de la rénine plasmatique. En effet, sous anesthésie à l'éther, on mesure une activité de rénine 2 fois supérieures à celle que l'on obtient lorsque le rat est endormi au Nembutal. Cet effet de l'anesthésie avait déjà été observé par Pettinger et al (44).

La partie purement méthodologique de cette étude s'achève ainsi et, munis d'une méthode fiable et reproductible, nous avons entrepris une étude biologique sur les rats.

APPLICATION A

L'ETUDE DE RATS SURRENALECTOMISES

Afin d'étudier comment les cellules de l'appareil juxtaglomérulaire libèrent la rénine sous l'effet d'une stimulation marquée, ou, au contraire la stockent lorsque la sécrétion est bloquée, nous avons étudié des rats placés sous deux conditions extrêmes : surrénalectomie et régime sans sel d'une part, puis substitution par la DOCA et surcharge en sel d'autre part.

La surrénalectomie représente l'un des plus forts stimuli de la sécrétion de rénine par les pertes de sel et d'eau qu'elle induit (11) et qui, dans notre étude ont encore été aggravées par le régime sans sel et les diurétiques. Nos résultats montrent que ce stimulus s'est révélé très efficace puisque, dans le groupe 1, l'activité de la rénine plasmatique augmente de près de 80 fois, par rapport aux valeurs observées chez des rats normaux. Une telle augmentation doit se refléter sur la concentration plasmatique de substrat et l'abaisser, ce qui est en effet le cas, puisque le substrat diminue de 5 fois dans le plasma.

A l'opposé, l'administration de DOCA et un régime riche en sel interrompent brutalement la sécrétion de rénine activée par la surrénalectomie (9,20,47) Pettinger et al (43) ont montré que la DOCA et le sel ramènent la rénine et le substrat plasmatiques à des valeurs proches de la normale en 48 heures. Nos résultats confirment cette observation, puisque l'activité de la rénine a baissé de 20 fois par rapport aux valeurs après surrénalectomie, tout en restant

3 à 4 fois supérieure à celle des rats contrôles. A nouveau, ces changements se reflètent sur la concentration du substrat, dont les valeurs redeviennent semblables à celles des contrôles.

Ces résultats montrent que les buts des deux traitements (stimulation intense, blocage abrupt) sur la sécrétion de rénine ont été atteints.

Les études effectuées sur le contenu du rein en rénine ne montrent pas les mêmes variations entre les deux groupes de rats. En effet, le traitement ne semble pas affecter le contenu du rein en rénine et on n'observe pas de différence entre les deux groupes. Ce résultat est surprenant, car la morphologie montre que les granules considérés comme la forme de stockage de la rénine, ont presque disparu après surrénalectomie, alors qu'ils réapparaissent nombreux sous DOCA et sel. Deux explications peuvent cependant concilier ces observations. Il se peut que toute la rénine intracellulaire ne se trouve pas sous forme de granules. De plus, le nombre des cellules juxtaglomérulaires est fortement augmenté après surrénalectomie, ce qui pourrait compenser une baisse du contenu intracellulaire en rénine et maintenir un contenu global du rein en rénine à peu près normal.

De plus grandes différences apparaissent cependant lorsqu'on acidifie l'homogénat de rein avant d'effectuer le dosage de la rénine. Deux points marquants se dégagent des résultats. Premièrement, l'acidification augmente le contenu du rein en rénine. Deuxièmement, cette augmentation est beaucoup plus forte pour le groupe des rats stimulés puis bloqués.

Plusieurs auteurs ont observé que la rénine peut exister sous deux formes, l'une active au pH habituel, l'autre inactive à ce pH, mais activée lorsqu'on l'expose au préalable à un pH bas, avant l'incubation au pH habituel. Cette réponse inhabituelle avait été signalée par Peart (41), Haas (26) et Goldblatt (22). Mais l'on pensait à un artefact jusqu'à ce que Skeggs montre l'existence de deux formes interconvertibles chez le porc : la rénine I était convertie en rénine II par un traitement acide. Par la suite, plusieurs formes de rénine acidifiable ont été décrites dans diverses espèces : chez l'homme, dans le liquide amniotique (13,32,37), dans le plasma (13) et dans le rein (13), dans le rein de porc (6) et de lapin (31). Selon Boyd (7) la forme inactive de la rénine est liée à une protéine et selon Leckie, à un inhibiteur (32).

Parallèlement à ces modifications biochimiques, la morphologie des cellules juxtaglomérulaires change. Il est frappant de constater que la rénine acidifiable augmente fortement, au moment où, la sécrétion ayant été bloquée, les cellules se remplissent de granules sécrétoires. Il est tentant de conclure que la rénine acidifiable représente la forme néo-synthétisée de l'hormone qui est stockée dans les granules nouvellement apparus. De plus, les structures paracristallines que l'on observe dans certains granules semblent n'apparaître que dans les granules nouvellement formés (4). Cet aspect particulier du contenu des granules pourrait donc correspondre à la rénine néo-synthétisée ou rénine acidifiable.

CONCLUSION GENERALE

Nous avons montré dans ce travail qu'il est possible d'élaborer une méthode pour le dosage de la ¹ rénine dans le plasma et les tissus de petits animaux. La réaction entre la rénine de rat et son substrat dépend des facteurs qui influencent classiquement les réactions enzymatiques.

En appliquant cette méthode à l'étude des processus intracellulaires qui président à la sécrétion de rénine, nous avons observé sur des rats placés dans des conditions extrêmes de stimulation et de blocage de la sécrétion, que l'hormone néo-synthétisée semble être stockée dans des granules sécrétoires, sous une forme inactive que l'on peut révéler par acidification. Ces interprétations permettent de réunir dans une même hypothèse les résultats biochimiques et morphologiques obtenus et éclairent d'un jour nouveau les processus de sécrétion de la rénine jusqu'ici encore assez mal connus.

BIBLIOGRAPHIE

1. Alexandre J.M., Devaux C., Meyer P., Baton M.G., Sabel A. et Millier P. : Microdosage de l'activité rénine plasmatique du lapin. *Revue Française d'études cliniques et biologiques*, pp. 492-495 (1967).
2. Antonello A., Baggio B., Favaro S., Corsini A., Todesco S., Borsatti A. : Effect on blood pressure of intravenous administration of a phospholipid renin preinhibitor and its active form in renal hypertensive rats. *Pflügers Arch* 341, 113-120, 1973.
3. Barajas L. and Latta H. : The Juxtaglomerular apparatus in Adrenalectomized rats. Light and Electron Microscopic Observations. *Lab. Invest.* 12, 1046-1059, 1963a.
4. Barajas L. : The development and ultrastructure of the juxtaglomerular cell granule; *J. Ultrastruct. Res.* 15, 400-413, 1966.
5. Boucher R., Ménard J., Genest J. : A micromethod for measurement of renin in the plasma and kidney of rats; *Canad. J. Physiol. Pharmacol.* 47, 881-890, 1967.
6. Boucher R., Veyrat R., De Champlain J. and Genest J. : New procedures for measurement of human plasma angiotensin and renin activity levels. (*Can. Med. Ass. J.*, 1964, 90, 194).
7. Boyd G.W. : A protein-bound form of porcine renal renin; *Circul. Research.* 38, 426-438, 1971.
8. Brown J.J., Davies D.L., Lever A.F., Parker R.A. and Robertson J.I.S. : The assay of renin in single glomeruli and the appearance of the juxtaglomerular apparatus in the rabbit following renal artery constriction. *Clin. Sci.* 30 : 223-235, 1966.
9. Christlieb A.R., Amsterdam E.A., Hickler R.B. : Suppression of murine renal renin activity in the absence of sodium retention with desoxycorterone acetate but not with depot desoxycorticosterone; *Amer. J. Physiol.* 263, 457-464, 1972.
10. Cook W.F. : Cellular localization of renin; in *Fisher Kidney Hormones*, pp. 117-128, Academic Press, London 1971.
11. Dauda G., Deveney I. : Bilateral adrenalectomy and renin-angiotensin system; *Acta Physiol. Acad. Sci. hung.* 39, 335-341, 1971.
12. Dauda G., Szokol M., Endes P. : Correlation between renal renin content and number of juxtaglomerular cells granular cells; *Acta Physiol. Acad. Sci. hung.* 33, 27-30, 1968.
13. Day R.P., Lutscher J.A., Gonzales C.M. : Occurence of big renin in human plasma, amniotic fluid and kidney extracts. *J Clin Endocr Metab* 40, 1078-1084, 1975.
14. De Jöng W. : Release of Renin by rat kidney slices : Relationship to plasma renin after Desoxycorticosterone and renal Hypertension. *Proc.Soc.esp. Biol.* 130 : 85-88, 1969.

15. Deveny I., Dauda G., Szabo J. : Juxtaglomerular index and activity of the renin-angiotensin system; *Path. europ.* 6, 19-33, 1971.
16. De Vito E., Cabbrera R.R., Fasciolo J.C. : Renin Production and Release by Rat Kidney Slices. *Amer. J. Physiol.* 219 : 1042-1045, 1970.
17. Dunihue F.W. : The effect of bilateral adrenalectomy on the juxtaglomerular apparatus; *Anat. Rec.* 98, 538-549, 1946.
18. Favre L : Etude cinétique de la réaction enzymatique de la rénine humaine avec différents substrat. Thèse No 3227. Université de Genève.
19. Favre L., Roussel-Deruyck R. et Valloton M.B. : Influence of pH on human renin activity with different substrates : rôle of substrate denaturation. *Biochim. Biophys. Acta* 293 : 1, 1973.
20. Fischer J.W. : Kidney hormones. Academic Press, London, 1971.
21. Fredlund P., Saltman S., Catt KJ : Stimulation of aldosterone production by angiotensin II peptides in vitro : enhanced activity of the (1-sarcosine analog. *J Clin Endocr Metab* 40, 746-749, 1975.
22. Goldblatt H., Haas E. : Renal mechanism of hypertension. In *Proceedings of the 6th Annual Conference on Nephrotic Syndrome*, edited by J. Metcoff, New-York, National Nephrosis Foundation, Inc. 117-138, 1955.
23. Goodwin F.J., Knowlton A.I., Laragh J.H. : Absence of renin suppression by desoxycorticosterone acetate in rats; *Amer. J. Physiol.* 216, 6, 1476-1480, 1969.
24. Gould A.B., Skeggs L.T. and Kahn J.R. : Measurement of renin and substrate concentration in human serum. *Lab. Invest.* 15 : 1802, 1966.
25. Gould A.B., Keighley G. and Low P.h. : On the presence of a renin-like activity in erythropoietin preparations. *Lab. Invest.* 18 : 2, 1968.
26. Haas E., Goldblatt H., Gibson C. and Lewish V. : Extraction, purification and assay of human renin free of angiotensinase *Circulation Res.* 19, 739, 1966.
27. Haas E., Lamfromm H., Goldblatt H. : Ultraviolet spectroscopy of renin; *Arch. Bioch. Biophys.* 44, 79-94, 1953.
28. Hartroft P.M. : The juxtaglomerular complex as endocrine gland; in *Bloodworth Endocrine Pathology*, pp. 644-677, Williams and Wilkin Baltimore, 1968.
29. Kotchen T.A., Flamenbaum W., Cirksema W., Gamble W., : Comparison of a biological and an immunological assay for the measurement of plasma renin activity. *J Clin Endocr Metab* 36, 804-810, 1973.
30. Kotchen T.A., Hedrick J.L., Miller M.C., Talwalkar R.T. : Effect of prostaglandins on the velocity of the reaction between human renin and homologous renin substrate. *J Clin Endocr Metab* 39, 530-536, 1974.
31. Leckie B. : The activation of possible zymogen of renin in rabbit kidney; *Clin. Sci.* 44, 301-304, 1973.
32. Leckie B., Mc Connel A. : A renin inhibitor from rabbit kidney; *Circul. Res.* 36, 513-519, 1975.

33. Lee M.R. : Renin and hypertension, Lloyd-Luke, London, 1969.
34. Lumbers E.R. : Activation of renin in human amniotic fluid by low pH; *Enzymologia* 40, 329-336, 1971.
35. Malik K.V., Nasjletti A. : Facilitation of adrenergic transmission by locally generated angiotensin II in rat mesenteric arteries. *Circul. Res.* 38, 26-30, 1976.
36. Ménard J. and Catt K. : Measurement of renin activity concentration and substrate in rat plasma by radioimmuno assay of angiotensin I. *Endocrinology* 90, 422-430, 1972.
37. Morris B.J., Lumbers E.R. : Activation of renin in human amniotic fluid by proteolytic enzymes; *Biochem. Biophys. Acta*, 289, 385-391, 1972.
38. Page I.H., McCubbin J.W. : Renin in renal hypertension, pp. 14-61, Year Book Medical Publishers Inc., Chicago, 1968.
39. Palade G.E., Siekevitz Ph., Caro L.G. : Structure, chemistry and function of the pancreatic exocrine cell; CIBA Symposium of the endocrine pancreas, London, Churchill 1962.
40. Peach M.J., Kline W.H., Watts D.T. : Release of adrenal catecholamines by angiotensin II. *Circul. Res.* 19, 571-575, 1966.
41. Peart W.S., : The renin-angiotensin system; *Pharmacol. Rev.* 17, 143-182, 1965.
42. Peter St., Lazar J. Gross F., Forssmann W.G. : Studies on the juxtaglomerular apparatus, II; Quantitative Morphology after adrenalectomy. *Cell. Tiss. Res.* 151, 457-469, 1974.
43. Pettinger W.A., Marchelle M., Augusto L. : Renin suppression by DOC and NaCl in the rat; *J. Physiol.* 221, 4, 1071-1074, 1971.
44. Pettinger W.A., Tanaka K., Keeton K., Campbell W.B., Brooks S.N. : Renin release, an artifact of anesthesia and its implications in rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 148, 625-630, 1975.
45. Poulsen K. : No evidence of active renin-inhibition in plasma. The kinetics of the reaction between renin and substrate in non-pretreated plasma. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 27 : 37, 1971.
46. Regoli D., Park W.K., Rioux F. : Pharmacology of angiotensin. *Pharmacol Rev.* 26, 69-123, 1974.
47. Siedel B., Bucher O., Peters-Haefeli L., Baechtold-Fowler N., Peters G. : The replenishment of Juxtaglomerular Renin Store after Temporary Renin Depletion. *Pflügers Arch.* 347, 125-135, 1974.
48. Rosset E., Scherrer J.R., Veyrat R. : Increased plasma renin substrate concentration in human malignant hypertension. *Helv Med Acta*, 37, 235-250, 1973.
49. Rouiller C., Orci L. : The structure of the juxtaglomerular complex in The Kidney, Morphology, Biochemistry, Physiology, Vol. 4, pp. 1-70, Academic Press, New-York, 1971.
50. Rubbin I. : Purification of hog renin : Properties of purified hog renin. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 29, 51-58, 1972.

51. Schaechtelin G., Riedel B. : Renin-Aktivität in Nieren ohne "Renin-Granula". Arch. Pharmacol. exp. Path. 255 : 65, 1966.
52. De Senarclens C. : Conditions expérimentales influençant la cinétique de la rénine et du substrat dans le plasma humain. Thèse No 3421, Université de Genève.
53. De Senarclens C., Pricam C., Banichahi F., Vallotton M.B. : Renin synthesis, storage and release in the rat : a morphological and biochemical study. Kidney Int (In press.).
54. Skeggs L.T., Kahn J.R., Lentz K.E. and Schamway N.P. : The preparation, purification and amino acid sequence of a polypeptide renin substrate. J. Exper. Med. 106 : 439, 1957.
55. Skeggs L.T., Lentz K.E., Kahn J.R., Hochstrasser H. : Studies on the preparation and properties of renin. Circul. Research. 21 (Suppl. II), 91-100, 1967.
56. Skinner S.T., Lumbers E.R., Symonde E.M. : Analysis of changes in the renin-angiotensin system during pregnancy; Clin. Sci. Mol. 42, 479-488, 1972.
57. Steven K., Hall J. : The nature of renin released in the dog following haemorrhage and frusemide; Pflügers Arch. 347, 323-328, 1974.
58. Szabo J., Deveney I. Ultrastructural data on different types of hyperplasia and hyperfunction of the juxtaglomerular apparatus : Acta Morphologica Acad.Sci. hung. 20, 39-48, 1972.
59. Tobian I. : Relationship of juxtaglomerular apparatus to renin and angiotensin; Circulation 25, 189-192, 1962.
60. Tobian I., Thompson J., Twedt R., Janecik. : The granulations of Juxtaglomerular cells in Renal Hypertension, Desoxycorticosterone and Post-Desoxycorticosterone Hypertension, Adrenal Regeneration Hypertension and Adrenal Insufficiency. J.Clin. Invest. 1958. 37 : 660-671, 1958.
61. Vallotton M.B., Page L.B. and Haber E. : Radioimmunoassay of angiotensin in human plasma. Nature (London) 215 : 714, 1967.
62. Vallotton M.B. : Radioimmunoassay of angiotensin I and determination of endogenous renin in human plasma. Acta. endocr. 61 : suppl. 138, 118, 1969.
63. Vallotton M.B., Favre L., Scholer-Markovic D. : Technical problems of the radioimmunoassay of angiotensin I and angiotensin II. Hormones pancréatiques, hormones de l'eau et des électrolytes; colloque Hôpital Saint-Antoine. Inserm, Paris, p. 407, 1972.
64. Vallotton M.B. : Radioimmunoassay of angiotensin I and II for clinical evaluation of renin-angiotensin system. 7th int. Congr. clin. chem. Genève/Evian, 1969. Lipids and miscellaneous vol. 3, p. 254, 1970.
65. Vallotton M.B. : Parallel radioimmunoassay of angiotensin I and of angiotensin II for measurement of renin activity and of circulating active hormone in human plasma. Immunological methods in Endocrinology (Federlin K., Hales C.N. and Kracht J., edit.). Symposium Ulm, 1970. Thème/Academic Press. Hormone and Metabolism. Res. Suppl. 3 : 94, 1971.
66. Walhäusl W.K., Lucas G.P., Conn J.W., Lutz J.H. and Cohen E.L. : Studies on the partial isolation of human renin. Biochim. Biophys. Acta 221 : 536, 1970.

